

利用分子標誌輔助選拔水稻低白堊質品系

郭婷玫¹、林順福¹、簡禎佑²、丁文彥³、林家玉³、陳榮坤⁴、廖大經^{5,*}

¹ 國立臺灣大學農藝學系

² 行政院農委會桃園區農業改良場作物改良課

³ 行政院農委會臺東區農業改良場作物改良課

⁴ 行政院農委會臺南區農業改良場嘉義分場

⁵ 行政院農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所農藝系

摘要

水稻近年的育種趨勢除了追求穩定高產的目標外，提升米質亦為重點方向之一。白堊質米粒不但容易造成碾米時米粒斷裂，白米外觀亦為消費者在選購小包裝米的重要參考依據；然白堊質常受到環境的影響，在不同品種間也存在著差異。本研究利用分子標誌輔助選拔 (marker-assisted-selection; MAS) 之技術，以白堊質率低的水稻品種「越光」及高產品種「台農 67 號」作為雜交親本，建立 F₂ 衍生系並區分為兩個族群進行。其中，先行利用 150 個衍生系以 112 個 SSR 及 InDel 分子標誌建立連鎖群圖譜，並評估該族群 F₂ 和 F_{2.3} 之白米白堊質粒率、白堊質面積與白堊質程度，以及株高、穗數與抽穗期等農藝性狀，以區間定位法定位得到三個重要數量性狀基因，分別位於第 5、7 及 12 對染色體處，其表現相關的分子標誌為 RM1248、CH0701 及 RM6306；另外再結合一組與「越光」食味品質表現相關的分子標誌 RM4108，共同作為另一族群(860 個 F₂ 衍生系)的篩選。由以上 4 個分子標誌篩選得到的 23 個優良品系，自 2011 年第 2 期作起分別種植於嘉

義、桃園及臺東，進行產量、米質及其他農藝性狀的綜合評估，再配合利用分子標誌針對這些獲選的優良品系中白堊質相關性狀之分離基因座進行純化和單株選拔，最後推薦 19 個米質佳、豐產的優質品系做為各參試單位命名及推廣之參考。

關鍵詞：水稻、分子標誌輔助選拔、低白堊質。

Marker-assisted Selection for Less Grain Chalkiness Lines of Rice

Ting-Mei Kuo¹, Shun-Fu Lin¹, Jen-You Jian², Wen-Yen Ting³, Chia-Yu Lin³, Rong-Kuen Chen⁴ and Dah-Jing Liao^{5,*}

¹ Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei 10617, Taiwan ROC

² Department of Crop Improvement, Taoyuan District Agricultural Research and Extension Station, Shinwu, Taoyuan 32745, Taiwan ROC

³ Department of Crop Improvement, Taitung District Agricultural Research and Extension Station, Taitung 95055, Taiwan ROC

⁴ Chiayi Branch Station, Tainan District Agricultural Research and Extension Station, Lucao, Chiayi 61151, Taiwan ROC

⁵ Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi 60044, Taiwan ROC

* 通信作者, djliao@dns.caes.gov.tw

投稿日期：2014 年 8 月 7 日

接受日期：2014 年 11 月 24 日

作物、環境與生物資訊 11:230-242 (2014)

Crop, Environment & Bioinformatics 11:230-242 (2014)

189 Chung-Cheng Rd., Wufeng, Taichung 41362, Taiwan ROC

ABSTRACT

Recently the trend in rice breeding is not only focused on higher and stable yield of grains, but also the quality of grains. The chalky grains are easily broken during the process of milling, and the appearance of grains is the important

reference for consumers when they are buying a small pack of rice. However, the trait of chalkiness is easily affected by environment, and it also varies among rice varieties. In this study, we used marker-assisted-selection (MAS) to select superior lines with less chalky grain. The F_2 derivative lines developed from a cross between varieties 'Koshihikari' (less chalkiness) and 'TNG67' (high yield) were divided into mapping population and MAS population. A total of 150 lines were used to establish linkage map with 112 SSR and InDel markers, and map QTLs (quantitative trait loci) related to the percentage of grains with chalkiness, area of chalky endosperm, degree of endosperm chalkiness, and some agronomic traits. Three QTLs mapped around markers RM1248, CH0701 and RM6306 were distributed on 5th, 7th and 12th chromosomes, respectively. These markers were applied to screen 860 F_2 derivative lines, and 23 superior lines were selected. These superior lines were planted in Taoyuan, Chiayi and Taitung to assess grain yield, grain quality and other agronomic traits, and were purified with SSR markers. Further characterization of 19 lines with excellent grain quality and high grain yield were recommended as the reference of extension and registration of plant variety properties for all participating breeding stations or research institutes.

Key words: Rice, Marker-assisted selection, Chalkiness.

前言

稻米是全球重要的糧食之一，近年隨著國家經濟與國民生活水平的提高，稻米生產從早期以高產為目標，近年亦重視品質的改良。稻米白堊質除了影響米粒透明度而不利於外觀品質外，也由於碎米粒增加而導致完整米比率降低，造成整體商品價值的損失。遺傳與環境因素同時影響米粒的白堊率以及白堊面積大小(Takeda *et al.* 1983, Kuo and Liu 1986)，而白堊質屬於數量性狀遺傳(Tan *et al.* 2000, Shi *et al.* 2002)，因此白堊質主要是數量性狀基因(quantitative trait loci; QTLs)與環境因素的交感效果，所以傳統育種方法對於選育低白堊質品系有其困難之

處。近年來隨著水稻分子標誌的開發，如 RFLP (restriction fragment length polymorphism)、RAPD (random amplified polymorphic DNA)、AFLP (amplified fragment length polymorphism)、SSR (simple sequence repeat) 及 SNP (single nucleotide polymorphism)等，以及統計方法的進步與電腦軟體運算能力的提升，使得 QTLs 的定位較以往更為精準，而利用分子標誌技術偵測影響米粒白堊質性狀 QTLs 的研究也日益增加。

目前已發表偵測白堊質性狀 QTLs 的連鎖圖譜族群大多以秈、粳雜交為主，例如 He *et al.* (1999)以秈稻品系'ZYQ8'與粳稻品系'JX17'雜交後代 F_1 之單倍體倍加(doubled-haploid; DH)族群為材料，測得影響白堊質 QTLs 主要位於第 8 及第 12 對染色體；Wan *et al.* (2005)則以粳稻品種'Asominori'與秈稻品種'IR24'雜交組合之染色體置換品系(chromosome segment substitution lines; CSSLs)為對象，在 8 個不同栽培環境下，一致測得影響稻米白堊質率之 QTLs 主要位於第 8 及第 9 對染色體。然而 Ebitani *et al.* (2008)及 Zhou *et al.* (2009)分別以粳稻品種越光與秈稻品種'Kasalath'之雜交組合，以及兩系雜交稻品種'PA64s'與粈稻品系'9311'之雜交組合的 CSSLs 為材料，卻發現主要影響白堊質之 QTLs 分別位於第 1 及第 7 對(Ebitani *et al.* 2008)，或者第 6 及第 7 對染色體上(Zhou *et al.* 2009)。而以粳、粳雜交後代族群分析稻米白堊質 QTLs 之研究則有 Kobayashi *et al.* (2007)以粳稻品種'Hana-echizen'與'Niigatawase'的雜交組合後代 F_2 及 F_3 族群為對象，測得影響稻米白堊質之 QTLs 位於第 3、第 4 及第 6 (主要)對染色體；Tabata *et al.* (2007)以粳稻品種'Chiyonishiki'與'Koshijiwase'雜交組合之 F_6 重組自交系(recombinant inbred lines; RILs)為材料，分析稻米白堊質有關之 QTLs

位於第 1、第 2 及第 8 對染色體上；而 Kepiro *et al.* (2008) 亦以粳稻品種 'Cypress' 與 'Panda' 雜交組合之 F₁₁ RILs 為材料，獲得控制稻米白堊質之 QTLs 位於第 2 及第 6 (主要) 對染色體上。

歸納以上文獻的研究結果顯示，影響稻米白堊質之 QTLs 位置因不同雜交組合而異，且易受栽培環境影響。臺灣以粳稻品種栽培為主，因此本研究以具有極少稻米白堊質且食味佳之優良粳稻品種「越光」，和廣適應性之穩定高產粳稻品種「台農 67 號」為雜交親本，產生 F₂ 雜交族群，並建立分子標誌遺傳圖譜。並依據 F_{2:3} 品系之性狀調查資料定位 QTLs，以進行分子標誌輔助選種工作，藉此探討影響稻米白堊質之基因表現，選育適合台灣栽培之高產且外觀品質優良之新品種。

材料與方法

一、試驗材料

本研究以粳稻品種「越光」為母本，以及另一粳稻品種「臺農 67 號」為父本，於 2008 年第 2 期作於臺南區農業改良場(以下簡稱臺南場)進行雜交獲得 F₁ 世代種子，種植 F₁ 世代植株經自交後獲得 F₂ 世代共計 1010 粒種子。其中，150 個 F₂ 單株種植及雜交親本於 2010 年第 1 期作在行政院農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所(以下簡稱嘉義分所)溫室種植做為基因定位用 F₂ 族群(mapping population)，其他 860 個單株則種植於桃園區農業改良場(以下簡稱桃園場)之田區中，成為分子標誌輔助選種用 F₂ 族群(MAS population)，田間管理與病蟲防治則參照良質米推薦方式。

二、建立 F₂ 連鎖群圖譜

2010 年第 1 期作種植於嘉義分所溫室之 150 株 F₂ 單株種植及雜交親本，約於 4 葉齡苗期時分別予以編號，並且剪取新鮮葉片樣本送交國立臺灣大學抽取 DNA 用以建立 F₂

連鎖群圖譜。本研究參考 Gramene database 設計引子來篩選多型性之 SSR 或 InDel 分子標誌，使用軟體 MAPMAKER 3.0 (Lincoln *et al.* 1993)，以 LOD 為 3.0 門檻值及最大遺傳距離 40 cM 之條件，進行分子標誌連鎖分析與遺傳距離估算，完成建立分子標誌連鎖圖譜，並以 MapChart 軟體進行遺傳圖譜之繪製。

三、QTLs 定位

本研究進行 QTLs 定位所使用族群為種植於嘉義分所溫室之 F₂ 族群，以及由單株收穫之 F_{2:3} 族群。F_{2:3} 族群於 2010 年第 2 期作種植分別在嘉義分所、桃園場與臺東區農業改良場(以下簡稱臺東場)種植，採隨機完全區集設計(RCBD)，2 重複，每重複種植 1 短行，每行有 10 株，單本植，雜交親本各種植 2 短行。F_{2:3} 族群調查性狀包括株高、抽穗期、白堊質率與白堊質面積等項目，以供 QTLs 定位分析使用。QTLs 定位係採用 Lander and Botstein (1989) 提出之區間定位法(interval mapping; IM)，使用軟體 Windows QTLs Cartographer 2.5 版(Wang *et al.* 2011) 進行定位分析，其中分子標誌距離若大於 40 cM 之區間則不用於 QTLs 的定位分析，LOD 門檻值則設定為 2.0。

四、利用分子標誌輔助選拔低白堊質品系

根據 QTLs 定位分析結果，選出與白堊質率 QTLs 緊密連鎖之分子標誌，以及已知位於品種「越光」第 3 對染色體與食味品質相關 QTLs 緊密連鎖之分子標誌(Wada *et al.* 2008)，利用這些分子標誌從 860 個 F_{2:3} 品系中篩選出具有優良基因型品系 50–60 個，也同時利用其他與食味品質及抽穗期有關之分子標誌進行篩選，最後篩選出 30–40 個同結合基因型的 F_{2:3} 品系。

五、選獲優良 F_{2:3} 品系在多地區進行白堊質及其他農藝性狀評估

2011 年第 1 期作篩選之優良 F_{2:3} 品系，

於同年第 2 期作分別於嘉義分所、桃園場及臺東場進行白垩質及其他農藝性狀評估，採 RCBD 設計，2 重複，每品系種植 3 行，行長度 2 公尺。調查性狀有抽穗期、株高、穗數、千粒重及穀粒產量等一般農藝性狀，以及白垩質率 (percentage of grains with chalkiness; PGWC)、白垩質面積 (area of chalky endosperm; ACE) 與白垩質程度 (degree of endosperm chalkiness; DEC) 等白垩質性狀。本研究供分析使用之糙米樣本係碾製 1 次，分析米粒白垩質相關性狀係使用日本 SATAKE 公司製造之穀粒判別器 (型號 RGQI20A)。白垩質性狀調查項目及調查方式說明如下：

白垩質率：計算 100 粒米粒中，含有白垩質米粒之比例。

白垩質面積：自 100 粒米粒中挑選白垩質米粒，並計算白垩質面積佔該米粒總面積的比例。

白垩質程度：由白垩質率與白垩質面積相乘而得。

六、統計分析

獲選品系間之白垩質率與白垩質面積使用變方分析比較其差異，以上統計分析使用 SAS/STAT 9.1 完成。

結果

一、F₂ 族群之白垩質性狀分佈

種植於嘉義分所溫室之 150 株 F₂ 族群之白垩質率與白垩質面積分佈如 Fig. 1、Fig. 2 顯示，雜交親本「越光」的白垩質率為 26.9%，另一親本「台農 67」號則為 95.0%，各單株之白垩質率範圍介於 0–100% 之間，而以 20–30% 為最多數。F₂ 族群米粒白垩質面積百分比變異範圍介於 0–62.5% 之間，以 8–15% 為最多，而雜交親本「越光」為 12.9%，「台農 67」號則為 47.4%。

二、連鎖圖譜之建立

本研究以 112 個 SSR 與 InDel 分子標誌

所建立之連鎖圖譜，共分為 15 個連鎖群，分別位於 12 對染色體上，總長為 1781.2 cM，相鄰分子標誌平均距離為 16.2 cM (Fig. 3)。

三、QTLs 定位

本研究以區間定位法分析 F₂ 族群之白垩質率、白垩質面積與白垩質程度等白垩質相關性狀與抽穗期性狀基因的表現，如 Table 1、Table 2 所示；F_{2,3} 族群白垩質相關性狀與株高、穗數及抽穗期等一般農藝性狀基因的表現如 Table 3、Table 4 所示。F₂ 族群與 F_{2,3} 族群共分別偵測到 8 個及 6 個與白垩質性狀相關的 QTLs，其中影響白垩質率的 QTLs，F₂ 族群有 3 個，F_{2,3} 族群有 1 個；影響白垩質面積的 QTLs，F₂ 族群有 3 個，F_{2,3} 族群有 3 個；影響白垩質程度的 QTLs，F₂ 族群有 2 個，F_{2,3} 族群有 2 個。另外，F_{2,3} 族群也偵測到影響一般農藝性狀的 QTLs 共計 12 個，包括了

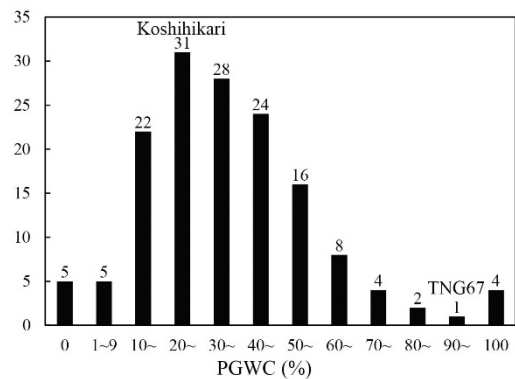


Fig. 1. Frequency distribution for PGWC in F₂ lines.

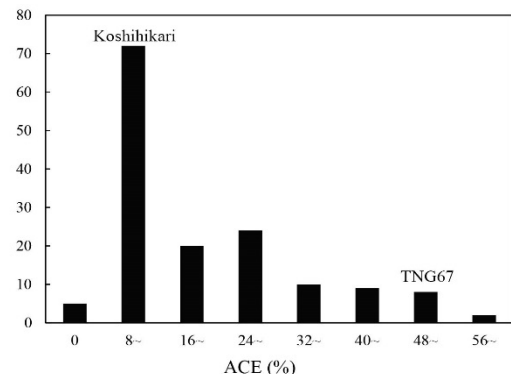


Fig. 2. Frequency distribution for ACE in F₂ lines.

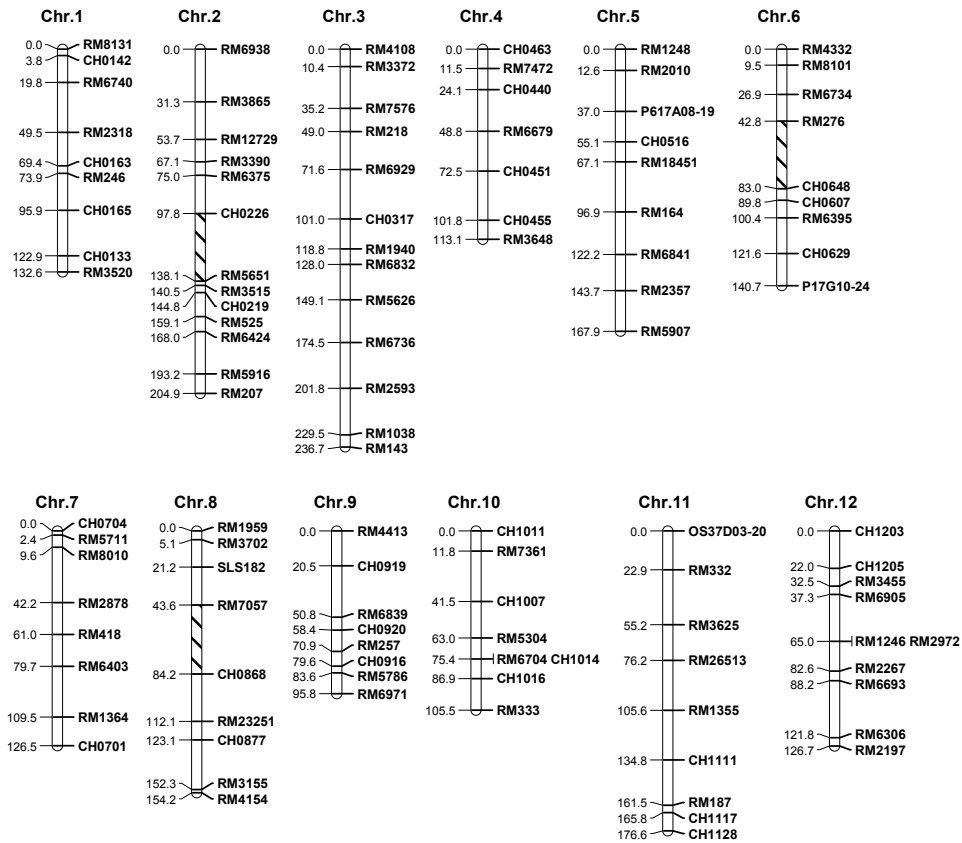


Fig. 3. Linkage map of a rice F₂ population, 'Koshihikari' × 'TNG67', constructed with 112 SSR and InDel DNA markers.

Table 1. Identification of QTLs for grain chalkiness related traits of a rice F₂ population, 'Koshihikari' × 'TNG67'.

Trait	QTLs	Chr.	Interval	Position (cM)	LOD	Additive effect	R ² (%)
PGWC ^z		2	RM525	0	1.8	3.97	7.4
	<i>q</i> -PGWC3	5	P617A08-19 - CH0516	4	2.0	-2.28	11.7
		6	CH0629	0	1.6	-4.12	6.5
	<i>q</i> -PGWC7a	7	RM8010 - RM2878	28	2.2	5.03	13.0
	<i>q</i> -PGWC7b	7	RM6403 - RM1364	12	3.1	13.11	31.2
ACE ^y	<i>q</i> -ACE5	5	RM2010 - P617A08-19	4	4.6	-6.94	22.2
		7	RM6403 - RM1364	16	1.5	5.86	14.2
	<i>q</i> -ACE8	8	RM1959	0	2.0	4.72	8.1
	<i>q</i> -ACE11	10	CH1016	0	1.5	4.69	6.3
		11	RM26513 - RM1355	20	2.3	6.89	22.5
DEC ^x	<i>q</i> -DEC5	5	RM2010 - P617A08-19	12	2.2	-302.54	13.2
	<i>q</i> -DEC7a	7	RM6403 - RM1364	14	2.8	569.72	30.6

^z percentage of grains with chalkiness.

^y area of chalky endosperm.

^x degree of endosperm chalkiness.

Table 2. Identification of QTLs for grain chalkiness related traits of a rice F_{2:3} population, 'Koshihikari' × 'TNG67' .

Trait	QTLs	Chr.	Interval	Position (cM)	LOD	Additive effect	R ² (%)
PGWC ^z		1	CH0165 - CH0133	16	1.6	-0.08	15.1
		2	RM6938	0	1.5	-1.37	6.7
		3	RM7576 - RM218	8	1.9	2.93	12.7
		4	CH0451 - CH0455	14	1.8	-2.21	14.8
		5	RM1248	0	1.8	-1.58	7.7
		7	RM1364 - CH0701	16	1.6	-0.39	7.6
	<i>q</i> -PGWC12	12	RM6693 - RM6306	18	2.3	0.04	24.7
ACE ^y		1	RM8131	0	1.8	0.84	8.0
	<i>q</i> -ACE2	2	RM6938	0	2.2	-2.53	9.3
	<i>q</i> -ACE3	3	CH0317 - RM1940	6	2.5	4.04	13.9
	<i>q</i> -ACE6	6	RM4332	0	2.0	-3.40	8.8
		7	RM2878	0	1.6	2.68	6.8
		7	RM1364 - CH0701	8	1.9	0.38	14.1
		10	CH1016	0	1.9	-0.58	8.1
DEC ^x	<i>q</i> -DEC2	2	RM6938	0	2.2	-58.36	9.6
	<i>q</i> -DEC7b	7	RM1364 - CH0701	12	2.0	-5.78	12.6

^z percentage of grains with chalkiness.

^y area of chalky endosperm.

^x degree of endosperm chalkiness.

Table 3. Identification of QTLs for days to heading of a rice F₂ population, 'Koshihikari' × 'TNG67' .

Trait	QTLs	Chr.	Interval	Position (cM)	LOD	Additive effect	R ² (%)
HD ^z	<i>q</i> -HD3a	3	RM1038	0	5.7	6.09	22.0
	<i>q</i> -HD6a	6	RM6734 - RM276	14	5.3	-5.93	22.7
	<i>q</i> -HD6b	6	CH0629 - P17G10-24	10	2.1	-0.98	16.1
	<i>q</i> -HD7	7	RM0810	0	2.2	3.95	9.4
	<i>q</i> -HD10	10	RM5304 - RM6704	4	9.3	-6.75	36.6

^z days to heading.

Table 4. Identification of QTLs for plant height, days to heading and panicle number of a rice F_{2:3} population, 'Koshihikari' × 'TNG67' .

Trait	QTLs	Chr.	Interval	Position (cM)	LOD	Additive effect	R ² (%)
PH ^z	<i>q</i> -PH1	1	CH0165 - CH0133	12	2.5	4.89	17.7
	<i>q</i> -PH2	2	RM3865 - RM12729	10	4.3	4.42	31.8
	<i>q</i> -PH3	3	RM2593 - RM1038	22	3.6	6.37	19.5
	<i>q</i> -PH6	6	RM6734 - RM276	14	2.1	-1.92	10.6
	<i>q</i> -PH10	10	RM5304	0	8.5	-8.33	31.9
	<i>q</i> -PH11	11	RM26513 - RM1355	6	2.5	-4.97	14.6
	HD ^y	<i>q</i> -HD2	2	RM3390	0	2.5	4.31
<i>q</i> -HD3b		3	RM6736 - RM2593	12	3.1	6.35	21.8
<i>q</i> -HD6a		6	RM6734 - RM276	14	2.2	-3.17	10.8
<i>q</i> -HD10		10	RM5304 - RM6704	4	15.2	-8.96	56.9
PN ^x	<i>q</i> -PN5	5	RM2357 - RM5907	24	3.8	-0.85	16.1
	<i>q</i> -PN10	10	RM5304	0	2.4	-1.66	10.3

^z plant height.

^y days to heading.

^x panicle number.

影響株高的 QTLs 有 6 個，影響穗數的 QTLs 有 2 個，以及影響抽穗期的 QTLs 有 4 個。

(一)白垩質率

F₂ 族群偵測到影響白垩質率的 QTLs 有 3 個 (Table 1)，分別位於第 5 對染色體 P617A08-1-CH0516 之區間內 (*q-PGWC3*)、第 7 對染色體 RM8010-RM2878 之區間內 (*q-PGWC7a*)、及第 7 對染色體 RM8010-RM2878 之區間內 (*q-PGWC7b*)。加性效應分別為 -2.28、5.03 與 13.11，外表型貢獻量分別為 11.7、13.0 及 31.2%。

F_{2.3} 族群偵測到 1 個影響白垩質率的 QTLs (Table 2)，位於第 12 對染色體 RM6693-RM6306 之區間內 (*q-PGWC12*)，加性效應為 0.04%，外表型貢獻量為 24.7%。

(二)白垩質面積

F₂ 族群偵測到影響白垩質面積的 QTLs 有 3 個 (Table 1)，分別位於第 5 對染色體 RM2010-P617A08-19 之區間內 (*q-ACE5*)、第 8 對染色體 RM1959 上 (*q-ACE8*)、及第 11 對染色體 RM26513-RM1355 之區間內 (*q-ACE11*)。加性效應分別為 -6.94、4.72 與 6.89，而外表型貢獻量則分別為 22.2、8.1 及 22.5%。

F_{2.3} 族群偵測到 3 個影響白垩質面積的 QTLs (Table 2)，分別位於第 2 對染色體 RM6938 上 (*q-ACE2*)、第 3 對染色體 CH0317-RM1940 之區間內 (*q-ACE3*)、及第 6 對染色體 RM4332 上 (*q-ACE6*)。加性效應分別為 -2.53、4.04 與 -3.40，外表型貢獻量分別為 9.3、13.9 及 8.8%。

(三)白垩質程度

F₂ 族群偵測到影響白垩質程度的 QTLs 有 2 個 (Table 1)，分別位於第 5 對染色體 RM2010-P617A08-19 之區間內 (*q-DEC5*) 及第 7 對染色體 RM6403-RM1364 之區間內 (*q-DEC7*)。加性效應分別為 -302.54 與 569.72，外表型貢獻量分別為 13.2% 與 30.6%。

F_{2.3} 族群偵測到 2 個影響白垩質程度的 QTLs (Table 2)，分別位於第 2 對染色體

RM6938 上 (*q-DEC2*) 及第 7 對染色體 RM1364-CH0701 之區間內 (*q-DEC7b*)。加性效應分別為 -58.36 與 -5.78，外表型貢獻量分別為 9.6% 與 12.6%。

(四)株高

F_{2.3} 族群偵測到影響株高的 QTLs 有 6 個 (Table 4)，分別位於第 1 對染色體 CH0165-CH0133 之區間內 (*q-PH1*)、第 2 對染色體 RM3865-RM12729 之區間內 (*q-PH2*)、第 3 對染色體 RM2593-RM1038 之區間內 (*q-PH3*)、第 6 對染色體 RM6734-RM276 之區間內 (*q-PH6*)、第 10 對染色體 RM5304 上 (*q-PH10*)、及第 11 對染色體 RM26513-RM1355 之區間內 (*q-PH11*)。加性效應分別為 4.89、4.42、6.37、-1.92、-8.33 與 -4.97 cm，外表型貢獻量分別為 17.7、31.8、19.5、10.6、31.9 及 14.6%。

(五)穗數

F_{2.3} 族群偵測到影響穗數的 QTLs 有 2 個 (Table 4)，分別位於第 5 對染色體 RM2357-RM5907 之區間內 (*q-PN5*)、及第 10 對染色體 RM5304 上 (*q-PN10*)。加性效應分別為 -0.85 穗與 -1.66 穗，外表型貢獻量分別為 16.1% 與 10.3%。

(六)抽穗期

F₂ 族群偵測到影響抽穗期的 QTLs 有 5 個 (Table 3)，分別位於第 3 對染色體 RM1038 上 (*q-HD3a*)、第 6 對染色體 RM6734-RM276 之區間內 (*q-HD6a*)、第 6 對染色體 CH0629-P17G10-24 之區間內 (*q-HD6b*)、第 7 對染色體 RM8010 上 (*q-HD7*)、及第 10 對染色體 RM5304-RM6704 之區間內 (*q-HD10*)。加性效應分別為 6.09、-5.93、-0.98、3.95 與 -6.75 d，外表型貢獻量分別為 22.0、22.7、16.1、9.4 及 36.6%。F_{2.3} 族群偵測到 4 個影響抽穗期的 QTLs (Table 4)，分別位於第 2 對染色體 RM3390 上 (*q-HD2*)、第 3 對染色體 RM6736-RM2593 之區間內 (*q-HD3b*)、第 6 對染色體 RM6734-RM276 之區間內 (*q-HD6a*)、及第 10 對染色體 RM5304-

RM6704 之區間內(*q-HD10*)。加性效應分別為 4.31、6.35、-3.14 與 -8.96 d，外表型貢獻量分別為 10.6、21.8、10.8 及 56.9%。

三、利用分子標誌輔助選拔優良基因型品系

綜合 F₂ 與 F_{2:3} 兩代結果從中選出與白堊質率表現相關的 QTLs，分別位於第 5、7 與 12 對染色體處，並且以與之連鎖的分子標誌 RM1248、CH0701 和 RM6306，以及另一與「越光」食味品質表現相關的分子標誌 RM4108，作為後續輔助選拔之用。利用以上 4 個分子標誌，以及 4 個與食味品質 (RM4332) 及抽穗期 (RM6704、RM1038 和

RM6734) 相關的分子標誌，針對相同雜交組合的 860 個 MAS 族群，共篩選出 24 個具有優良基因型的水稻品系 (Table 5)。除了品系 T613 之 4 組分子標誌皆與「越光」基因型相同，為同質結合基因型外，其餘 23 個品系則有 1 組分子標誌為異質結合基因型，而其餘 3 組分子標誌皆為同質結合基因型。

四、優良基因型品系於不同地區之白堊質與一般農藝性狀表現

23 個具有優良基因型的水稻 F_{2:4} 品系，於 2011 年第 2 期作分別於嘉義分所、桃園場及臺東場種植，並且調查白堊質率、白堊質面積與白堊質程度，以及株高、穗數與抽穗期等一般農藝性狀表現 (Tables 6 and 7)，其

Table 5. Genotypes of DNA makers associated with grain chalkiness, eating quality and days to heading traits for 24 rice superior lines.

Line	RM1248	CH0701	RM6306	RM4108	RM4332	RM6704	RM1038	RM6734
	PGWC	PGWC	PGWC	Eating quality	<i>W_x</i>	<i>Ehd1</i>	<i>Hd6/Hd16</i>	<i>Hd1</i>
C54	H ^z	K ^y	K	K	H	H	T ^x	H
C133	K	K	K	H	H	H	K	H
C145	K	H	K	K	K	H	K	K
C180	K	K	H	K	T	T	H	K
C184	K	K	K	H	T	H	H	T
C187	K	K	K	H	K	K	K	K
C212	K	H	K	K	K	H	K	T
T23	K	H	K	K	K	T	H	H
T65	K	H	K	K	T	T	H	T
T132	K	K	H	K	T	K	H	T
T136	H	K	K	K	K	K	H	K
T239	K	K	H	K	H	T	T	K
T297	K	H	K	K	H	T	K	H
T309	K	K	K	H	T	H	K	H
T404	K	K	K	H	H	T	H	K
T415	K	K	K	H	H	H	H	K
T430	K	K	K	H	T	K	H	H
T448	K	H	K	K	T	T	T	H
T477	K	K	K	H	H	T	K	T
T509	K	K	H	K	K	K	T	K
T593	K	H	K	K	K	H	H	T
T607	H	K	K	K	T	H	T	T
T613	K	K	K	K	T	H	K	H
T624	K	K	H	K	K	H	K	K

^zK: same genotypes as 'Koshihikari'.

^yT: same genotypes as 'TNG67'.

^xH: heterozygous genotypes.

中桃園場及臺東場之白堊質相關性狀調查因缺植較多故未列入統計分析。針對嘉義分所調查之白堊質率與白堊質面積進行變方分析顯示，不同品系間白堊質率呈極顯著差異，而白堊質面積則不存在顯著差異(Table 8)。其中除 C54 品系之平均白堊質率 29.2%大於親本「台農 67 號」之 27.8%外，其他品系之平均白堊質率均小於「台農 67 號」。而所有品系之白堊質面積均超過 50%，介於 54-90%之間。三個地區之一般農藝性狀，除了 T477 品系的平均抽穗期 68.3 d，大於親本「台農 67 號」之 65 d 以外，其他品系均小於 65 d。株高除了 C133 與 T477 品系高於「台農 67 號」之平均值 109.9 cm 外，其他品係均低於「台農 67 號」。

五、優良品系之基因型純化及單株選拔

以五組分子標誌 RM1248、CH0701、RM6306、RM4108 及 RM4332，針對 23 個優良品系中與白堊質粒率及食味品質相關基因座於前世代為異結合基因型者進行純化，在 F_{2.5} 中篩選同結合型單株，可避免該基因座於後代繼續分離。其中 13 個品系僅有 1 組分子標誌分離如 Table 9 所示，各品系可選取與越光相同之同型結合個體，以避免後代基因型繼續分離；另有 6 個品系有 2 組分子標誌分離如 Table 10 所示，各品系需選取兩分子標誌基因型均與越光相同的同型結合個體。理論上單一基因座分離出任一種同結合基因型之比例為 3/8，在 95%之信心水準下，若種

Table 6. Grain chalkiness related traits for 23 rice superior lines (F_{2.4}) obtained by marker assisted selection.

Line	PGWC (%)			ACE (%)			DEC		
	repeat1	repeat2	average	repeat1	repeat2	average	repeat1	repeat2	average
C54	25.6	32.8	29.2	90	90	90.0	2304.0	2952.0	2628.0
C133	14.7	13.5	14.1	54	90	72.0	793.8	1215.0	1004.4
C145	17.7	18.9	18.3	90	90	90.0	1593.0	1701.0	1647.0
C180	5.0	5.0	5.0	72	72	72.0	360.0	360.0	360.0
C184	2.6	3.6	3.1	54	54	54.0	140.4	194.4	167.4
C187	20.1	19.1	19.6	72	90	81.0	1447.2	1719.0	1583.1
T23	20.3	20.7	20.5	90	90	90.0	1827.0	1863.0	1845.0
T65	20.6	20.3	20.5	90	90	90.0	1854.0	1827.0	1840.5
T132	7.3	7.5	7.4	72	72	72.0	525.6	540.0	532.8
T136	8.3	9.9	9.1	90	90	90.0	747.0	891.0	819.0
T239	13.6	15.8	14.7	90	72	81.0	1224.0	1137.6	1180.8
T297	16.3	18.6	17.5	90	72	81.0	1467.0	1339.2	1403.1
T309	9.8	8.1	9.0	90	72	81.0	882.0	583.2	732.6
T404	16.8	17.6	17.2	90	90	90.0	1512.0	1584.0	1548.0
T415	10.5	9.1	9.8	90	72	81.0	945.0	655.2	800.1
T430	10.5	9.1	9.8	72	54	63.0	756.0	491.4	623.7
T448	21.3	22.1	21.7	72	90	81.0	1533.6	1989.0	1761.3
T477	13.2	12.9	13.1	72	54	63.0	950.4	696.6	823.5
T509	11.8	7.8	9.8	90	72	81.0	1062.0	561.6	811.8
T593	15.0	10.3	12.7	90	90	90.0	1350.0	927.0	1138.5
T607	7.8	16.7	12.3	54	90	72.0	421.2	1503.0	962.1
T613	8.6	8.6	8.6	90	72	81.0	774.0	619.2	696.6
T624	13.5	11.0	12.3	90	72	81.0	1215.0	792.0	1003.5
Koshihikari	3.5	4.3	3.9	54	54	54.0	189.0	232.2	210.6
TNG67	29.9	25.6	27.8	72	90	81.0	2152.8	2304.0	2228.4

植 8 株可望至少獲得一株預期之基因型，故本試驗針對單一基因型分離之品系種植 10 株，而兩對基因分離之品系則種植 20 株。試驗結果顯示，在 13 個單一分子標誌分離品系中，除了 C187 品系未能獲得預期基因型個體外，其餘 12 個品系均能獲選 1 株以上之預期基因型個體。在 6 個 2 組分子標誌分離品系

中，除了 T239 品系未能獲得預期基因型個體外，其他 5 個品系亦均能選獲 1 株以上之預期基因型個體。而 C187 與 T239 品系再次分析 10 株幼苗後，亦均能獲得 1 株預期基因型個體。以上 19 個獲選品系除了可增加遺傳純度外，亦可降低白堊質米粒比例，可同時提高米粒外觀與食味品質。

Table 7. Days to heading and plant height for 23 rice superior lines ($F_{2:4}$) obtained by marker assisted selection.

Line	Days to heading				Plant height (cm)			
	Chiayi	Taoyuan	Taitung	average	Chiayi	Taoyuan	Taitung	average
C54	56	51	61	56.0	106.6	100.3	99.5	102.1
C133	56	55	63	58.0	122.0	107.8	101.7	110.5
C145	63	54	67	61.3	110.8	108.8	104.0	107.9
C180	43	47	46	45.3	83.4	68.5	78.1	76.7
C184	46	47	51	48.0	97.2	90.2	81.2	89.5
C187	43	51	54	49.3	96.8	91.1	85.0	91.0
T23	63	53	65	60.3	115.0	105.9	102.2	107.7
T65	63	52	65	60.0	116.6	105.7	102.5	108.3
T132	43	47	44	44.7	85.8	68.5	82.1	78.8
T136	50	50	53	51.0	92.2	88.4	89.8	90.1
T239	59	51	62	57.3	101.8	104.1	100.1	102.0
T297	69	53	66	62.7	102.0	98.2	102.1	100.8
T309	50	47	51	49.3	100.0	95.2	91.9	95.7
T404	59	51	61	57.0	98.0	93.9	87.0	93.0
T415	43	49	45	45.7	83.6	85.5	81.4	83.5
T430	46	47	50	47.7	97.8	86.7	88.6	91.0
T448	59	52	65	58.7	101.4	94.4	91.2	95.7
T477	73	56	76	68.3	134.0	106.9	101.7	114.2
T509	50	48	52	50.0	98.2	92.6	89.4	93.4
T593	50	51	51	50.7	104.8	101.2	92.2	99.4
T607	43	50	46	46.3	83.0	80.2	86.9	83.4
T613	43	48	46	45.7	80.2	88.3	89.5	86.0
T624	50	48	51	49.7	103.0	93.0	92.9	96.3
Koshihikari	46	46	-	46.0	96.4	79.8	-	88.1
TNG67	73	57	-	65.0	128.8	91.0	-	109.9

Table 8. ANOVA of chalkiness related traits of 23 rice superior lines ($F_{2:4}$).

SOV	PGWC			ACE		
	df	MS	F-test	df	MS	F-test
Line	22	75.30	16.69**	22	201.06	1.47
Block	1	1.43	0.32	1	63.39	0.46
Error	22	4.51		22	137.03	

** significant at 1% level, respectively.

Table 9. Genotypic selection for 13 rice superior lines F_{2.5} by one marker.

Line	Marker	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	K ^z	T ^y	H ^x
C145	CH0701	K	K	K	T	T	-	K	K	K	K	0.78	0.22	0.00
C184	RM4108	K	K	K	T	K	K	K	K	K	T	0.80	0.20	0.00
C187	RM4108	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	0.00	1.00	0.00
T23	CH0701	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	1.00	0.00	0.00
T65	CH0701	T	T	T	T	K	K	K	-	T	K	0.44	0.56	0.00
T132	RM6306	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	1.00	0.00	0.00
T136	RM1248	K	K	K	T	K	K	K	T	K	K	0.80	0.20	0.00
T309	RM4108	T	H	T	K	K	K	K	K	K	H	0.60	0.20	0.20
T448	CH0701	T	T	H	K	T	T	K	T	T	T	0.20	0.70	0.10
T477	RM4108	K	T	H	K	K	K	K	H	K	T	0.60	0.20	0.20
T593	CH0701	H	T	H	T	T	T	K	T	H	T	0.10	0.60	0.30
T613	RM4108	K	K	K	H	K	K	K	K	K	K	0.90	0.00	0.10
T624	RM6306	H	T	T	K	K	H	K	H	H	T	0.30	0.30	0.40

^zK: same genotypes as 'Koshihikari' .

^yT: same genotypes as 'TNG67' .

^xH: heterozygous genotypes.

Table 10. Genotypic selection for 6 rice superior lines F_{2.5} by two markers.

Line	Marker	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C54	RM1248	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	RM4332	T	H	H	T	T	T	T	T	K	K
C133	RM4108	-	T	T	T	T	-	T	T	T	T
	RM4332	T	T	K	K	K	K	K	K	K	K
T239	RM6306	H	H	T	T	H	H	K	T	T	K
	RM4332	T	H	T	K	K	H	T	K	K	T
T297	CH0701	K	H	K	H	H	H	K	H	K	K
	RM4332	T	T	T	H	H	K	T	T	H	T
T404	RM4108	K	K	K	H	T	H	T	T	K	K
	RM4332	K	H	H	T	H	T	T	T	H	T
T415	RM4108	H	K	K	T	K	T	K	H	K	K
	RM4332	T	H	T	T	K	K	K	H	T	K

Table 10. (continued)

Line	Marker	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	K ^z	T ^y	H ^x
C54	RM1248	T	T	T	T	K	T	T	T	T	T	0.05	0.95	0.00
	RM4332	H	H	T	T	T	H	T	H	T	T	0.10	0.60	0.30
C133	RM4108	T	T	T	-	-	K	T	T	T	T	0.06	0.94	0.00
	RM4332	K	K	K	K	-	T	K	K	K	K	0.21	0.79	0.00
T239	RM6306	H	K	K	H	H	T	-	K	-	H	0.28	0.28	0.44
	RM4332	H	H	K	K	K	K	T	T	T	H	0.40	0.35	0.25
T297	CH0701	-	-	H	-	K	K	K	K	K	K	0.65	0.00	0.35
	RM4332	K	T	T	H	K	K	T	T	K	H	0.25	0.50	0.25
T404	RM4108	T	T	T	T	K	K	K	H	T	H	0.40	0.40	0.20
	RM4332	K	H	K	T	T	H	K	K	T	T	0.25	0.45	0.30
T415	RM4108	T	T	H	-	T	H	T	K	T	T	0.37	0.42	0.21
	RM4332	K	K	T	H	T	H	K	K	T	T	0.40	0.40	0.20

^zK: same genotype as 'Koshihikari' .

^yT: same genotypes as 'TNG67' .

^xH: heterozygous genotypes.

討論

本研究以 112 組多型性分子標誌用於建立連鎖圖譜，但是在第 2、第 6 及第 8 對染色體仍有較大之區間，雖然對於這 3 個區間持續篩選分子標誌，卻仍無法篩選出多型性分子標誌，所以未來有必要增加該區間之分子標誌數目。

應用於分子標誌輔助選拔主要依據 $F_{2:3}$ 族群所定位，與影響白堊質性狀之 QTLs 連鎖的分子標誌，而 F_2 族群的定位結果則供做參考用。原因在於 F_2 族群試驗材料係單株栽培於溫室，可能受到高溫影響定位結果。 $F_{2:3}$ 族群具有 2 重複之短行評估，並且在田間環境下進行性狀調查，因此 QTLs 分析結果對於分子標誌的選擇較具應用價值。

$F_{2:3}$ 族群 QTLs 定位顯示，影響白堊質面積的 $q-ACE2$ 與影響白堊質程度的 $q-DEC2$ 均位於第 2 對染色體 RM6938 上，外表型貢獻量分別為 9.3% 與 9.6%，均非主效 QTLs。而影響白堊質性狀主效 QTLs，如白堊質率的 $q-PGWC12$ 、白堊質面積的 $q-ACE3$ ，與白堊質程度的 $q-DEC7b$ 則各別位於不同染色體上，以上結果說明白堊質面積與白堊質程度二者之間的關係密切，其中位於第 7 對染色體 RM1364 分子標誌之鄰近區域為論在 F_2 族群或在 $F_{2:3}$ 族群之 PGWC、ACE 及 DEC 等三個性狀均測得相關之 QTLs。

利用分子標誌輔助選拔 23 個優良基因品系，除 C54 品系外，其他品系的白堊質率及白堊質程度均小於親本「台農 67 號」。依據「中華民國國家標準」(CNS 總號 2425，類號 N1059)之規定，白米外觀品質為 CNS 一等米者，白粉質粒在 5% 以下，符合該項標準有 C180 與 C184 等 2 個品系；CNS 二等米者，白粉質粒在 10% 以下，符合該項標準有 T132、T136、T309、T415、T430、T509 與 T613 等 7 個品系；CNS 三等米者，白粉質粒在 15% 以下，符合該項標準有 C133、T239、T477、T593、T607 與 T624 等 6 個品系，總

計有 15 個品系符合 CNS 各級標準，佔全體優良品系之 65%，顯示利用分子標誌輔助選拔低白堊質米粒品系確有其效果。

本研究於早世代(F_2 世代)即開始利用分子標誌輔助選拔，可減少傳統育種改良過程中所需之人力和時間，避免環境變動影響選拔效果。由於遺傳圖譜建立及田間外表性狀調查充份配合，故能偵測有關 QTLs 位置，以利用緊密連鎖之分子標誌完成品系選拔及純化。期望未來可利用分子標誌輔助選拔之方式，改善不易進行傳統育種選拔之性狀，藉此縮短育種年限，提高育種效率。

誌謝

本研究承行政院農業委員會計畫(100 農科-9.2.1-糧-Z1 及 101 農科-9.2.1-糧-Z1)補助經費，特此誌謝。

引用文獻

- Ebitani T, Y Yamamoto, M Yano, M Funane (2008) Identification of quantitative trait loci for grain appearance using chromosome segment substitution lines in rice. **Breed. Res.** 10:91-99.
- He P, SG Li, Q Qian, TQ Ma, JZ Li, WM Wang, Y Chen, LH Zhu (1999) Genetic analysis of rice grain quality. **Theor. Appl. Genet.** 98:502-508.
- Kepiro JL, AM McClung, MH Chen, KM Yeater, RG Fjellstrom (2008) Mapping QTLs for milling yield and grain characteristics in a tropical japonica long grain cross. **J. Cereal Sci.** 48:477-485.
- Kobayashi A, B Genliang, Y Shenghai, K Tomita (2007) Detection of quantitative trait loci for white-back kernels under high temperature stress in japonica rice varieties. **Breed. Sci.** 57:107-116.
- Kuo YC, C Liu (1986) Inheritance of Chalkiness of Rice Endosperm. (in Chinese) **J. Agric. Res. China.** 35:129-138.
- Lander ES, Botstein D (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics.** 121:195-199.
- Lincoln SE, MJ Daly, ES Lander (1993) Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER/EXP Version 3.0: A Tutorial and

- reference manual. 3rd ed. A Whitehead Institute for Biomedical Research Technical Report.
- Shi CH, JG Wu, XB Lou, J Zhu, P Wu (2002) Genetic analysis of transparency and chalkiness area at different filling stages of rice (*Oryza sativa* L.). **Field Crops Res.** 76:1–9.
- Tabata M, H Hirabayashi, Y Takeuchi, I Ando, Y Lida, R Ohsawa (2007) Mapping of quantitative trait loci for the occurrence of white-back kernels associated with high temperatures during the ripening period of rice (*Oryza sativa* L.). **Breed. Sci.** 57:47–52.
- Takeda K, K Saito (1983) Heritability of kernel weight and white belly frequency in rice and genetic correlation. **Jpn. J. Breed.** 33:468–480.
- Tan YF, YZ Xing, JX Li, SB Yu, CG Xu, QF Zhang (2000) Genetic bases of appearance quality of rice grains in Shanyou 63, an elite rice hybride. **Theor. Appl. Genet.** 101:823–829.
- Wada T, T Ogata, M Tsubone, Y Uchimura, Y Matsu (2008) Mapping of QTLs for eating quality and physicochemical properties of the *japonica* rice 'Koshikari'. **Breed. Sci.** 58:427–435.
- Wan XY, JM Wan, JF Weng, L Jiang, JC Bi, CM Wang, HQ Zhai (2005) Stability of QTLs for rice grain dimension and endosperm chalkiness characteristics across eight environments. **Theor. Appl. Genet.** 110:1334–1346.
- Wang S, CJ Basten, ZB Zeng (2011) Windows QTL Cartographer 2.5, Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, N.C.
- Zhou L, L Chen, L Jiang, W Zhang, L Liu, X Liu, Z Zhao, S Liu, L Zhang, J Wang, J Wan (2009) Fine mapping of the grain chalkiness QTL *qPGWC-7* in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.** 118:581–590.